

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
12 août 2004 (12.08.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/067010 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 31/57, A61P 25/00

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/000086

(22) Date de dépôt international :
16 janvier 2004 (16.01.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) Langue de publication : français

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :
— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement

(30) Données relatives à la priorité :
03/00507 17 janvier 2003 (17.01.2003) FR

Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
MAPREG [FR/FR]; 17, rue du Faubourg Montmartre, F-75009 Paris (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BAULIEU, Etienne-Emile [FR/FR]; 16, rue Berteaux-Dumas, F-92200 Neuilly-sur-Seine (FR). FELLOUS, Esther [FR/FR]; 3, rue Gracieuse, F-75005 PARIS (FR). ROBEL, Paul [FR/FR]; 36, rue Santos Dumont, F-75015 PARIS (FR).

(74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques. etc.; Cabinet Reginbeau, 20 rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

(54) Title: USE OF 3-METHOXY-PREGNENOLONE IN THE PRODUCTION OF A MEDICAMENT FOR TREATING NEURODEGENERATIVE DISEASES

(54) Titre : UTILISATION DE LA 3-METHOXY-PREGNENOLONE POUR LA PRÉPARATION D'UN MEDICAMENT DESTINÉ A TRAITER LES MALADIES NEURODEGENERATIVES

(57) Abstract: The invention relates to a novel use of derivatives of neurosteroids, particularly pregnenolone, for the treatment of acute or chronic lesions of the nervous system, especially certain neurodegenerative diseases, related in particular to the ability thereof to stabilize and/or increase the polymerization of neuronal microtubules.

(57) Abrégé : L'invention se rapport à une nouvelle utilisation de dérivés de neurostéroïdes, notamment de la prégnénolone, pour le traitement des lésions aiguës ou chroniques du système nerveux, en particulier certaines maladies neurodégénératives, liée notamment à leur aptitude à stabiliser et/ou augmenter la polymérisation des microtubules neuronaux.

WO 2004/067010 A1

UTILISATION DE LA 3-METHOXY-PREGNENOLONE POUR LA PREPARATION D'UN MEDICAMENT DESTINE A TRAITER LES MALADIES NEURODEGENERATIVES

L'invention se rapporte à une nouvelle utilisation de dérivés de neurostéroïdes, notamment de la prénolone, pour le traitement des lésions aiguës ou chroniques du système nerveux, en particulier certaines maladies neurodégénératives, liée notamment à leur aptitude à stabiliser et /ou augmenter la polymérisation des microtubules neuronaux.

Une altération du cytosquelette des neurones est observée dans la plupart des lésions du SNC et des maladies neurodégénératives. Cette altération peut être la conséquence mais aussi la cause d'une souffrance des cellules affectées. En effet, une dépolymérisation des microtubules peut être directement responsable du dysfonctionnement de certains neurones et entraîner leur mort. De plus, ces altérations affectent le nombre et la longueur des prolongements neuritiques des cellules neuronales restantes et par conséquent diminue leur efficacité. Un traitement avec du NGF qui prévient l'atrophie dendritique permet une meilleure récupération fonctionnelle après une lésion du cortex cérébral chez le rat (Kolb et al., *Neuroscience* 1996). La dégradation du cytosquelette observée après un traumatisme du SNC (Zhang et al., *J Neuropathol exp Neurol* 2000) ou un épisode d'ischémie, résulte de nombreux facteurs, en particulier de l'augmentation du glutamate et du Ca⁺⁺ intracellulaire qui entraîne une dépolymérisation des microtubules, et de l'activation de protéases comme la Calpaïne qui dégradent MAP2. L'utilisation d'un inhibiteur de la calpaïne (Schumacher et al, *J Neurochem* 2000) et du relargage du glutamate (Springer et al., *J Neurochem* 1997) permet de diminuer les conséquences d'un traumatisme médullaire chez l'animal en préservant partiellement le cytosquelette.

La réparation des lésions récapitule le développement. L'existence de cellules souches dans certaines régions du système nerveux central est actuellement bien établie. Les lésions stimulent la prolifération de ces cellules. Cependant ces cellules doivent migrer et se différencier. La différenciation implique au premier chef le développement du cytosquelette.

Les protéines MAP2 représentent un des constituants majeurs des protéines associées aux microtubules neuronaux. Elles sont présentes dans toutes les

extensions de ce qui constitue l'arborisation dendritique d'un neurone, arborisation dont on connaît l'importance pour l'établissement des connexions synaptiques (Matus, *Microtubules* 1994 ; Sanchez et al *Prog.Neurobiol* 2000). Les protéines MAP2 sont absolument requises pour la formation des dendrites comme le montrent les travaux d'auteurs qui, par la suppression de synthèse de MAP2 ont provoqué soit l'arrêt de croissance neuritique dans des neurones en culture (Caceres et al, *Neuron* 1992) soit l'arrêt de croissance dendritique chez des souris « knock out » pour le gène MAP2 (Harada et al, *J.Cell.Biol.* 2002). La synthèse des protéines MAP2 n'est pas à elle seule suffisante pour induire ce processus de croissance dendritique. Certains stéroïdes comme l'oestradiol ou la progestérone peuvent induire une augmentation de synthèse de MAP2 (Reyna-Neyra et al, *Brain Res.* 2002) sans induire de changements morphologiques spectaculaires. Par contre, certaines molécules se liant à MAP2 ont la propriété fort importante et originale de renforcer l'activité de cette protéine, à savoir son rôle dans l'activation du processus de polymérisation de la tubuline (Murakami et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 2000) et l'établissement de structures microtubulaires d'une plus grande stabilité.

Il a été récemment montré que, après une ischémie cérébrale, des cellules souches pouvaient se différencier en neurones et s'intégrer dans les circuits neuronaux existant (Nakatomi et al., *Cell* 2002). La stimulation de la croissance des neurites de ces cellules par des molécules améliorant la polymérisation de la tubuline pourrait augmenter leur fonctionnalité.

Malgré de nombreuses recherches, aucune cible spécifique autre que des MAPs, n'a été identifiée à l'heure actuelle pour la PREG.

La protéine MAP2 est principalement présente dans les neurones. Les molécules se liant à MAP2 ont donc pour cible les cellules nerveuses. Ainsi, il est probable qu'elles n'ont pas d'action notable sur les autres types cellulaires dans lesquelles la concentration de MAP2 est très faible.

Les études montrant un effet de la prégnénolone (PREG) *in vivo* sont peu nombreuses mais sont en faveur d'un rôle bénéfique de ce stéroïde. Il a été montré que la PREG diminuait la réaction astrocytaire après une lésion cérébrale (Garcia-Estrada et al, *Int J Devl Neuroscience* 1999) et l'augmentation de la taille des astrocytes observée au cours du vieillissement (Legrand et Alonso, *Brain Res*

1998). Elle contribuait aussi à améliorer la récupération fonctionnelle après un traumatisme médullaire (Guth et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1994), La PREG protège des cellules issues d'une lignée hippocampique (HT-22) d'une toxicité induite par le glutamate et la protéine bêta amyloïde (Gursoy et al.; *Neurochem Res* 5 2001).

La PREG est le précurseur de toutes les hormones stéroïdes. Leur synthèse implique la conversion de la structure $\Delta 5\text{-}3\beta\text{-OH}$ de la PREG en structure $\Delta 4\text{-}3\text{-céto}$ (assurée par une enzyme dénommée $3\beta\text{HSD}$). La Demanderesse a bloqué la structure $\Delta 5\text{-}3\beta\text{-OH}$ pour empêcher son métabolisme et empêcher également la formation d'ester sulfate de PREG, molécule qui peut être neurotoxique à hautes concentrations. Ainsi, la Demanderesse a mis en évidence un composé, la 3-méthoxy-prégnénolone ($3\beta\text{-méthoxy-prégna-5\text{-ène-20-one}$, en abrégé 3-méthoxy-PREG), qui possède cette propriété et qui de plus est au moins aussi actif que la PREG. La stabilité métabolique de ce composé a été vérifiée par spectrométrie de 10 masse couplée à la chromatographie gazeuse.

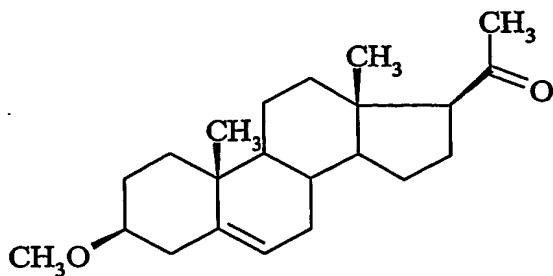
15

La Demanderesse considère ainsi que l'invention se rapporte à la 3-méthoxy-PREG, mais aussi à toutes les molécules dérivées de la prégnénolone, portant une fonction 3-méthoxy ou présentant une fonction 3' pouvant être 20 convertie en 3-méthyl-éther). Ces molécules sont alors incapables de se convertir en métabolites pourvus d'activités progestatives (la progesterone est un métabolite directe de la PREG et, en plus de son activité hormonale, elle est un antagoniste de la PREG pour la polymérisation des microtubules), androgéniques, estrogéniques et glucocorticoïdes. Elles ne peuvent pas également se convertir en esters sulfates qui, 25 à l'instar du sulfate de PREG, pourraient avoir des effets neurotoxiques.

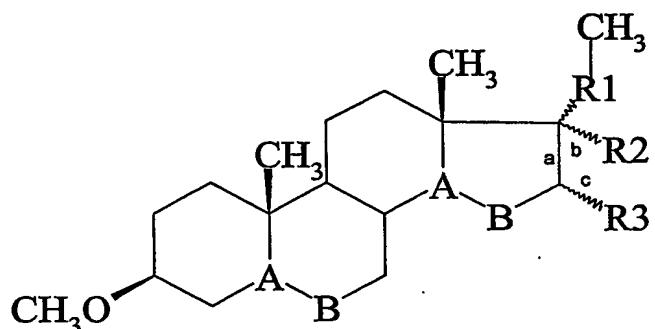
Dans le cadre de la présente invention, la Demanderesse a mis en évidence le fait que la 3-méthoxy-PREG, ou d'autres molécules selon l'invention peuvent jouer un rôle majeur dans la polymérisation et/ou la stabilisation des microtubules, et présente des activités tout à fait remarquables, pour le traitement de pathologies 30 liées au système nerveux.

Par "pathologies liées au système nerveux", on entend les pathologies liées au système nerveux central ou périphérique, particulièrement celles dans lesquelles les microtubules neurocellulaires sont affectés.

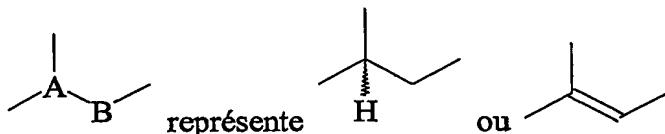
La 3-méthoxy-PREG présente la formule suivante :



5 Ainsi, l'invention se rapporte à l'utilisation de la 3-méthoxy-PREG ou d'une molécule dérivée de la prégnénolone portant une fonction 3-méthoxy et incapable de se convertir en métabolite ou esters sulfate de prégnénolone, pour la préparation d'un médicament destiné à stimuler la polymérisation et/ou la stabilisation des microtubules pour traiter une lésion aiguë ou chronique ou une maladie
10 dégénérative du système nerveux, ladite molécule présentant la formule générale I :



dans laquelle :

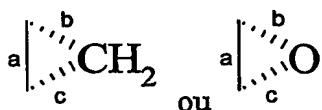


R1 = -CO- ; -CH(OH)- ou -CH(O-COCH3)-

15 R2 = H ou CHCl₂,

R3 = H ou CH₃, ou

R2 et R3 forment ensemble un cycle :



Dans un mode de réalisation préféré, ladite molécule est la 3-méthoxy-PREG (3 β -méthoxy-prégna-5-ène-20-one).

Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la 3 β -méthoxy-prégna-5-ène-20-one-17 α -dichlorométhyl.

5 Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la 3 β -méthoxy-5 α -prégna-20-one.

Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la 3 β -méthoxy-5 α -prégna-20 β -ol.

10 Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la 3 β -méthoxy-PREG-16 α -méthyl.

Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la 3 β -méthoxy-PREG-16 β -méthyl.

Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la 3 β -méthoxy-prégna-5,14-diène-20-one.

15 Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la 3 β -méthoxy-PREG-16 α ,17 α -époxy.

Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la 3 β -méthoxy-PREG-16 α , 17 α -méthylène.

20 Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la 3 β -méthoxy-Prégnane-5-ène-3 β ,20 β -diol-20-acétate.

Dans un autre mode de réalisation, ladite molécule est la 3 β -méthoxy-5 α -prégna-20-one-16 α -méthyl.

La 3-méthoxy-PREG peut, dans le cadre de la présente invention être utilisée pour préparer un médicament utile pour le traitement d'autres syndromes comme le ralentissement mental et la perte de concentration, la douleur incluant, la douleur aiguë, la douleur post-opératoire, la douleur chronique, la douleur nociceptive, la douleur neuropathique, les syndromes de douleur psychogéniques, la douleur associée aux neuropathies périphériques, certains états psychiatriques (notamment les états dépressifs), des épisodes dissociatifs incluant l'amnésie dissociative, la fugue dissociative et le désordre d'identité dissociatif, d'autres

maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson, la maladie d'Huntington, les maladies liées aux prions, la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), la sclérose en plaques.

D'une façon générale, on utilise la 3-méthoxy-PREG ou la molécule dérivée 5 selon l'invention pour le traitement de toute maladie pour laquelle une polymérisation et/ou une stabilisation accrue des microtubules est recherchée ou bénéfique.

Dans un mode de réalisation préféré selon l'invention, ladite maladie est choisie dans le groupe constitué de la maladie d'Alzheimer, la maladie de 10 Parkinson, la perte de mémoire induite par l'âge, la perte de mémoire induite par la prise de substances, une lésion traumatique, une lésion cérébrale, une lésion de la moelle épinière, en particulier une compression médullaire, l'ischémie, la douleur, notamment la douleur névritique, la dégénérescence nerveuse, et la sclérose en plaques.

15 Dans un mode de réalisation préféré, et notamment pour le traitement des maladies liées à un dérèglement du système nerveux central, ledit médicament comprend également un excipient ou un composé permettant de formuler ladite 3-méthoxy-PREG pour permettre une meilleure traversée de la barrière hémato-encéphalique. Un tel excipient ou composé peut aussi permettre une traversée plus 20 rapide ou plus durable de ladite barrière hémato-encéphalique.

Un tel excipient ou composé peut être un peptide, tels les peptides décrits dans la demande WO 00/32236; ou de la 2-pyrrolidone.

Les compositions pharmaceutiques utilisées dans l'invention peuvent être administrées par n'importe quelle voie d'administration incluant, mais sans se 25 limiter, la voie orale, intraveineuse, intramusculaire, intra artérielle, intra médullaire intra ventriculaire, transdermique, sous-cutanée, intra péritonéale, intra nasale, entérale, topique, sublinguale, ou rectale.

On peut envisager un traitement continu ou à long terme directement effectué par l'intermédiaire du liquide cérébro-spinal en utilisant une pompe 30 implantée dans l'espace sub-arachnoïdien du cerveau ou de la moelle épinière. Un tel implant pourrait contenir une solution concentrée de 3-méthoxy-PREG (par exemple de l'isopropyl-beta-cyclodextrine diluée avec du liquide céphalo-rachidien artificiel)

De plus, la 3-méthoxy-PREG peut être administrée avec d'autres composés d'agents biologiquement actifs (par exemple des tensioactifs, des excipients, des transporteurs, des diluants et/ou des véhicules pharmaceutiquement acceptables). Ces composés sont bien connus de l'homme du métier. On peut trouver des détails 5 sur ces produits dans la dernière édition de Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, Pa.).

Dans les compositions pharmaceutiques de la présente invention pour l'administration orale, sublinguale, sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, transdermique, locale ou rectale, l'ingrédient actif (3-méthoxy-PREG ou molécule 10 dérivée) peut être administré sous formes unitaires d'administration, en mélange avec des supports pharmaceutiques classiques, applicables aux animaux ou aux êtres humains. Les formes unitaires d'administration appropriées comprennent les formes par voie orale telles que les comprimés, les comprimés enrobés, les dragées, les gélules et capsules de gélatine molle, les poudres, les granules et les solutions ou 15 suspensions orales, les formes d'administration sublinguale et buccale, les formes d'administration sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, intra nasale ou intraoculaire et les formes d'administration rectale.

Les compositions pharmaceutiques peuvent également contenir des conservateurs, solubilisants, stabilisants, agents mouillants, émulsifiants, 20 édulcorants, colorants, arômes, des sels destinés à modifier la pression osmotique, des tampons, des correcteurs de goût ou des antioxydants. Elles peuvent également contenir d'autres substances thérapeutiquement activés.

Ainsi, les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent également contenir d'autres agents neuroprotecteurs, notamment, des composés qui 25 augmentent la régénération neuronale. De tels agents peuvent être en particulier choisis parmi les facteurs de croissance des neurones comme les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF), acide ou basique, FGF-3, FGF-4, FGF-6, ou le facteur de croissance des kératinocytes (KGF). On peut également envisager l'ajout d'un agent neuroprotecteur tel le facteur de croissance nerveux (NGF), le facteur 30 neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), la neurotrophine 3 ou 4, le TGF-beta.1, les interleukines, les facteurs de croissance dérivés de l'insuline (IGFs).

On peut aussi utiliser tout autre type d'agents thérapeutiques antioxydants et neuroprotecteurs, notamment les inhibiteurs du glutamate.

Lorsque l'on prépare une composition solide sous forme de comprimés, on mélange l'ingrédient actif principal avec un véhicule pharmaceutique tel que la gélatine, l'amidon, le lactose, l'acide stéarique ou le stéarate de magnésium, le talc, la gomme arabique ou analogues. On peut enrober les comprimés de saccharose ou 5 d'autres matières appropriées ou encore on peut les traiter de telle sorte qu'ils aient une activité prolongée ou retardée et qu'ils libèrent d'une façon continue une quantité prédéterminée de principe actif.

On obtient une préparation en gélules en mélangeant l'ingrédient actif avec un diluant et en versant le mélange obtenu dans des gélules molles ou dures, avec 10 comme excipient des huiles végétales, des cires, des graisses, des polyols semi-solides ou liquides etc...

Une préparation sous forme de sirop ou d'élixir peut contenir l'ingrédient actif conjointement avec un édulcorant, un antiseptique, ainsi qu'un agent donnant du goût et un colorant approprié. On utilise des excipients tels l'eau, les polyols, le 15 saccharose, le sucre inverti, le glucose...

Les poudres ou les granules dispersibles dans l'eau peuvent contenir l'ingrédient actif en mélange avec des agents de dispersion ou des agents mouillants, ou des agents de mise en suspension, de même qu'avec des correcteurs du goût ou des édulcorants.

20 Pour une administration rectale, on recourt à des suppositoires qui sont préparés avec des liants fondant à la température rectale, par exemple du beurre de cacao ou des polyols semi-solides ou liquides tels les poly-éthylène-glycols, des cires, des huiles naturelles ou hydrogénées, des graisses...

Pour une administration parentérale, intranasale ou intraoculaire, on utilise 25 des suspensions aqueuses, des solutions salines isotoniques ou des solutions stériles et injectables qui contiennent des agents de dispersion et/ou des agents mouillants pharmacologiquement compatibles. On peut utiliser, comme excipient, l'eau, des alcools, des polyols, le glycérol, des huiles végétales...

Le principe actif peut être formulé également sous forme de microcapsules, 30 éventuellement avec un ou plusieurs supports additifs.

Pour le traitement de la douleur, la voie d'application topique est la voie d'administration préférée. Ici, les compositions selon l'invention peuvent être présentées sous forme d'un gel, d'une pâte, d'un onguent, d'une crème, d'une

lotion, d'une suspension liquide aqueuse, aqueuse-alcool, d'une solution huileuse, d'une dispersion du type lotion ou sérum, d'un gel anhydre ou lipophile, ou d'une émulsion de consistance liquide ou semi-solide de type lait, obtenue en dispersant une phase grasse dans une phase aqueuse ou vice versa, ou de suspensions ou les 5 émulsions de cohérence(consistance) douce, semi-solide de la crème ou le type de gel, ou alternativement de microémulsions, de microcapsules, de microparticules ou de dispersions vésiculaires au type ionique et-ou nonionique. Ces compositions sont préparées selon des méthodes standard.

De plus, un tensioactif peut être inclus dans la composition afin de permettre 10 une pénétration plus profonde de la 3-méthoxy-PREG.

Parmi les ingrédients envisagés, l'invention comprend les agents permettant une augmentation de pénétration choisis par exemple dans le groupe consistant en l'huile minérale, l'éthanol, la triacétine, la glycérine et le glycol de propylène; des agents de cohésion sont choisis par exemple dans le groupe consistant en le 15 polyisobutylène, l'acétate de polyvinyle, l'alcool de polyvinyle et les agents d'épaississement.

Ainsi, dans un mode de réalisation préféré selon l'invention, ledit médicament se présente sous forme injectable.

Dans un autre mode de réalisation préféré selon l'invention, ledit 20 médicament se présente sous forme permettant une prise orale.

D'une manière préférée, ledit médicament comprend une quantité efficace de 3-méthoxy-PREG, en particulier comprise entre 50 et 2500 mg par voie parentérale.

Ledit médicament comprend préférentiellement une quantité efficace de 3-25 méthoxy-PREG ou de molécule dérivée de la prégnénolone présentant une fonction 3-méthoxy, telle que la quantité administrée au patient soit comprise entre 1 et 100 mg / kg.

Une quantité efficace de 3-méthoxy-PREG est une quantité qui permet, au sens de la présente invention, la stabilisation et/ou polymérisation des microtubules 30 après administration à l'hôte. Ainsi, l'administration d'une quantité efficace de 3-méthoxy-PREG aboutit à l'amélioration ou l'élimination de la maladie. La quantité de 3-méthoxy-PREG administrée à l'hôte variera en fonction de facteurs, y compris la taille, l'âge, le poids, la santé générale, le sexe, le régime alimentaire et le

moment de l'administration, la durée ou les particularités de la maladie associée à la dépolymérisation/déstabilisation des microtubules. Par exemple, le dosage devra réaliser, au niveau du site d'action, une concentration de l'ordre de 0,5 à 100 µM. L'ajustement des doses est bien connu de l'homme du métier.

5 L'invention se rapporte donc à une utilisation thérapeutique de la 3-méthoxy-PREG. L'invention se rapporte donc à ce composé en tant que médicament.

Une composition pharmaceutique, comprenant de la 3-méthoxy-PREG, ou un composé dérivé de la prégnénolone ayant une fonction 3-méthoxy de formule 10 générale I, en tant que principe actif, et un excipient pharmaceutiquement acceptable, est également un objet de l'invention.

La Demanderesse a mis en évidence l'activité de la 3-méthoxy-PREG pour stabiliser et/ou induire la polymérisation des microtubules d'une cellule.

Ainsi, d'une façon plus générale, l'invention se rapporte à une méthode pour 15 augmenter la stabilisation et/ou induire la polymérisation des microtubules dans une cellule comprenant l'étape d'exposer ladite cellule en présence de 3-méthoxy-PREG, à une concentration d'environ 0,5 à 100 µM, de préférence 0,5 à 50 µM. La polymérisation des microtubules peut être indiquée et repérée par un immuno-marquage de la protéine MAP2 associée à ces microtubules. De façon préférée, 20 cette méthode est mise en œuvre *in vitro*, mais peut être mise en œuvre *in vivo*, ou *ex vivo* (sur des cellules isolées d'un patient, traitées *in vitro* et réinjectées) dans certains cas.

L'invention se rapporte également à une méthode pour augmenter la poussée des neurites dans une cellule comprenant l'étape d'exposer ladite cellule en 25 présence de 3-méthoxy-PREG, à une concentration d'environ 0,5 à 50 µM. Cette méthode est également mise en œuvre *in vitro* de façon préférée, sans exclure d'autres modes de mise en œuvre si besoin est.

L'invention a également pour objet une méthode pour réduire la dépolymérisation des microtubules et/ou la rétractation des neurites dans une 30 cellule, comprenant l'étape d'exposer ladite cellule en présence de 3-méthoxy-PREG, à une concentration d'environ 0,5 à 50 µM. Cette méthode est également mise en œuvre *in vitro* de façon préférée, sans exclure d'autres modes de mise en œuvre si besoin est.

L'invention se rapporte aussi à une méthode pour le traitement et/ou la prévention d'une maladie induite ou accompagnée par une dépolymérisation des microtubules chez un patient comprenant l'étape d'administration d'une quantité efficace de 3-méthoxy-PREG audit patient, ou à une méthode pour le traitement 5 et/ou la prévention d'une maladie ou d'une lésion neurodégénérative chez un patient comprenant l'étape d'administration d'une quantité efficace de 3-méthoxy-PREG audit patient.

Enfin, une méthode pour le traitement d'un patient après compression ou 10 traumatisme médullaire comprenant l'étape d'administration d'une quantité efficace de 3-méthoxy-PREG audit patient, est également objet de l'invention.

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1: Cinétique de polymérisation des microtubules *in vitro*: effets de la PREG (prégnénolone) et de la molécule 43B (3-méthoxy-PREG). Un mélange de MAP2 et 15 de tubuline purifiées est effectué en présence de GTP à 4°C dans une cuvette de spectrophotomètre. La polymérisation est induite par chauffage à 37°C et suivie par l'augmentation de densité optique (DO) indicatrice de la quantité de polymères formés. En présence de PREG et de la molécule 43B, le temps de latence est diminué alors que la vitesse de polymérisation et la quantité de microtubules sont 20 nettement augmentées comparativement à la cinétique témoin (control) en présence de solvant seul.

Figure 2 : Effet de la PREG et de la 3-méthoxy-PREG (43B) sur la longueur moyenne des neurites des cellules PC12. Les cellules PC12 ont été cultivées pendant 3 jours en présence de NGF (10 ng/ml) avec ou sans (témoin) addition des 25 molécules PREG ou 43B (30µM). Chaque molécule a été testée sur trois trous de culture. Les mesures ont été effectuées à l'aide du logiciel Scion Image sur 200 cellules par trou.

Figure 3 : Relation dose-effet de la molécule 43B sur la longueur moyenne des neurites des cellules PC12. Les cellules PC12 ont été cultivées en présence de NGF (10 ng/ml) et de concentrations croissantes de 3-méthoxy-PREG (43B). La longueur 30 des neurites a été mesurée sur 200 cellules par trou après 2, 5 et 8 jours de culture.

Figure 4 : Immuno-marquage de MAP2 associé aux microtubules des cellules PC-12 traitées avec PREG ou 3-méthoxy-PREG. Les cellules PC12 ont été cultivées en

présence de NGF (10 ng/ml) et de PREG ou 3-méthoxy-PREG (20 µM). Elles ont été fixées et exposées à des anticorps anti-MAP2 qui visualisent exclusivement MAP2 associée aux microtubules.

- Figure 5 : Rétraction des neurites induite par le nocodazole. Après 7 jours de culture
5 en présence de NGF (10 ng/ml), les cellules ont été prétraitées pendant une heure avec la PREG (30µM) ou 43B (30µM), puis exposées au nocodazole pendant 15 min. (colonnes blanches : solvant DMSO seul ; colonnes grises: Nocodazole).

Figure 6: Toxicité de l'acide okadaïque. Protection par les stéroïdes.

- Les cellules de neuroblastome humain SH SY5Y ont été cultivées pendant 24
10 heures en présence d' acide okadaïque seul ou associé à des concentrations croissantes de PREG ou de 3-méthoxy-PREG. La mortalité cellulaire a été indiquée par la libération de lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture.

- Figure 7: Effet de la molécule 43B sur la récupération locomotrice des rats après une compression médullaire. La locomotion des animaux a été évaluée en aveugle
15 dans l'intervalle 1-28 jours après l'opération par le score BBB qui évalue le degré des paralysies (il est d'autant plus élevé que la récupération est meilleure). Signification statistique : * : p<0.001 ; ** : p<0.0001

- Figure 8: Effet de la molécule 43B sur l'incoordination motrice de souris transgéniques exprimant l'isoforme la plus longue de la protéine tau humaine dans
20 leurs neurones.

- L'incoordination motrice a été évaluée en aveugle pendant 12 semaines après insertion sous-cutanée d'implant vide ou contenant soit de la PREG soit de la 3-méthoxy-PREG (43B). La vitesse maximum de rotation du tambour de Rotarod avant la chute est une mesure de la coordination motrice (elle est d'autant plus
25 grande que l'effet du traitement est meilleur).

Figure 9 : Cinétique d'apparition de la 3-méthoxy-PREG (43B) dans le cerveau et la moelle épinière des rats après une injection sous cutanée (12mg/kg) de 43B en solution dans de l'huile de sésame.

30

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention.

EXEMPLES

Exemple 1 : synthèse de la 3-méthoxy-PREG

10 g (52 mmol) de p-toluènesulfonyl chloride sont ajoutés à une solution de 5g (15,8 mmol) de prégnénolone dans 30 ml de pyridine. L'ensemble est laissé sous agitation pendant 14 heures, puis versé dans 100 ml d'eau distillée. Après refroidissement du milieu réactionnel à 0°C, l'ensemble est filtré et le solide blanc obtenu est séché sous vide pour fournir 7,4 g (98%) de tosylate de prégnénolone.

Les 7,4 g de tosylate de prégnénolone sont portés au reflux du méthanol (50 ml) pendant 4 heures. Après refroidissement et évaporation du solvant, le brut réactionnel est repris dans 100 ml d'éthyle et lavé 3 fois avec 100 ml d'une solution 10 % de bicarbonate de sodium. Après séchage de la phase organique sur Na₂SO₄, celle-ci est évaporée à sec sous pression réduite pour fournir 5,2g (100%) de 3-méthoxy-PREG sous forme d'une poudre blanche.

Une nouvelle synthèse de 3-méthoxy-PREG a été réalisée à l'échelle du kilogramme. La pureté du produit final a été confirmée par RMN et était supérieure à 97,5 %, avec un seul contaminant mineur facilement séparable par HPLC.

La prégnénolone peut être obtenue à bas prix de sources commerciales.

Exemple 2 : Test d'activité de la 3-méthoxy-PREG. Comparaison avec la PREG

Ce test mesure *in vitro* l'effet de molécules sur la polymérisation des microtubules induite par MAP2. Cette polymérisation se produit quand des protéines MAP2 et de la tubuline sont mélangées à des concentrations adéquates en présence de GTP. Elle s'accompagne d'une augmentation de la densité optique mesurée à 345 nm pendant 15 à 30 minutes avec un spectrophotomètre UNICON thermostaté à 37°C (figure 1).

On voit que la molécule 43B, correspondant à la 3-méthoxy-PREG, active la polymérisation des microtubules comme la prégnénolone (PREG). D'autres molécules, comme la progestérone et le sulfate de prégnénolone, ne la stimulent pas mais sont antagonistes de la PREG (non montré).

Exemple 3 : modèles cellulaires

Effet des molécules sur la croissance neuritique

Pour tester l'effet sur la croissance neuritique de molécules sélectionnées, nous avons utilisé dans un premier temps la lignée PC12 qui est employée depuis

longtemps pour de nombreuses recherches en neurobiologie. Les cellules de cette lignée, issue d'un phéochromocytome de rat, forment, en présence de NGF (Nerve Growth Factor, facteur de croissance nerveux), des prolongements neuritiques contenant des microtubules auxquels sont associées des MAPs. La croissance de ces
5 prolongements est stimulée par l'addition de PREG. En présence de PREG [30µM], l'augmentation de la longueur moyenne des neurites après 4 jours de culture atteint 60%. Le screening d'autres stéroïdes naturels ou synthétiques de synthèse a permis de sélectionner plusieurs molécules présentant des effets supérieurs à ceux de la PREG (Figure 2). En particulier, l'addition de la molécule 43B, qui peut être
10 facilement synthétisée à partir de la PREG, entraîne une augmentation spectaculaire (pouvant atteindre 500%) de la longueur des neurites formés en présence de NGF (Figure 3). Cette croissance de neurites accompagne la stimulation par 43-B de l'association de MAP2 aux microtubules (Figure 4).

15 *Effet des stéroïdes sur la résistance des microtubules au nocodazole*

Le nocodazole est un agent dépolymérisant des microtubules. Son addition à des cultures de cellules PC12, différenciées en présence de NGF, entraîne une rétraction des neurites résultant de la dépolymérisation de leurs microtubules. Le prétraitement des cellules par la PREG ou par 43B rend les neurites résistants au
20 nocodazole, en raison d'une augmentation de la stabilité des microtubules, condition nécessaire à la formation de longs neurites. (Figure 5).

Effet des stéroïdes sur la cyto-toxicité de l'acide okadaïque

25 L'acide okadaïque est un inhibiteur des phosphatases de protéines. Or l'hyperphosphorylation de la protéine tau est impliquée dans la dépolymérisation des microtubules et dans la mort des cellules du neuroblastome humain SH SY5Y. L'exposition de cultures de cellules SY5Y à l'acide okadaïque entraîne effectivement une importante mortalité cellulaire. Celle-ci est diminuée par
30 l'addition simultanée de PREG et bien plus fortement par celle de 3-méthoxy-PREG (43 B) (figure 6).

Exemple 4 : Tests de toxicité

Toxicité cellulaire

Les tests de toxicité cellulaire sont réalisés en routine sur la lignée cellulaire PC12. Les premiers résultats obtenus montrent que la PREG et le 43B ne présentent pas de toxicité à des concentrations allant jusqu'à leur limite de solubilité (environ 5 50µM).

Toxicité in vivo

L'injection journalière pendant 1 mois de 48mg/kg de 43B (soit 4 fois la dose active dans les traumatismes médullaires) n'a affecté ni le poids moyen ni le comportement des rats.

10

Exemple 5 : Expériences *in vivo* – Traumatismes médullaires*Modèle de contusion médullaire*

Pour déterminer les effets neuroprotecteurs des molécules testées, un modèle de compression médullaire est utilisé. Ce modèle entraîne une paralysie totale des animaux les premiers jours suivant l'opération. Cette période de paralysie est suivie d'une phase d'environ trois semaines pendant laquelle les animaux récupèrent partiellement leur fonction motrice. L'étude de cette récupération à l'aide d'un test fonctionnel simple et précis reposant sur l'observation des animaux (BBB score) permet d'étudier la vitesse et le degré de récupération des animaux avec ou sans traitement.

Deux groupes de rats ont subi une compression médullaire. Les animaux ont ensuite reçu pendant 2 semaines, une injection sous-cutanée quotidienne contenant, soit de l'huile de sésame seule (groupe témoin, n=20), soit de l'huile de sésame contenant la molécule 43B (groupe 43B, n=20 ; 12mg/kg/jour). La première injection a été effectuée 5 min après la compression médullaire. La locomotion des animaux a été évaluée en aveugle 1, 4, 7, 14, 21 et 28 jours après l'opération par le score BBB. Trois animaux ont dû être exclus de l'étude dans chaque groupe. L'analyse statistique des résultats par le test non paramétrique de Mann-Whitney montre que les animaux traités avec 43B présentent des résultats très significativement supérieurs aux animaux témoins dès le septième jour après l'opération (Figure 7).

Exemple 6 : Expériences *in vivo* – Ischémie cérébrale

Deux modèles d'ischémie cérébrale chez le rat ont été développés.

Le premier est un modèle d'ischémie focale permanente ou transitoire de l'artère cérébrale moyenne par électrocoagulation ou clampage (évaluation de la neuroprotection par quantification du volume de la zone lésée).

- 5 Le deuxième est un modèle d'ischémie cérébrale globale et transitoire. Ce modèle est réalisé chez le rat en électrocoagulant et sectionnant les artères vertébrales puis en clampant les artères carotides pendant une durée de 15 min (évaluation de la neuroprotection et de l'augmentation de la plasticité cérébrale par quantification de la perte neuronale dans la zone CA1 de l'hippocampe et par des
10 tests de mémoire).

Exemple 7 : Expériences *in vivo* – Modèle de maladie neurodégénérative de type Alzheimer (souris transgéniques)

Afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de 43B pour le traitement des
15 maladies neurodégénératives de type Alzheimer, on peut utiliser une lignée homozygote de souris transgéniques, telles les souris décrites par Götz, (EMBO J. 1995;14(7):1304-13).

Ces souris expriment l'isoforme humaine la plus longue de la protéine tau. Elles présentent des symptômes de dysfonctionnement neurologique qui se
20 traduisent par une faiblesse musculaire et une diminution de la coordination motrice corrélées histologiquement à l'apparition de neurites anormaux et de protéines tau hyperphosphorylées comme dans la maladie d'Alzheimer. Cette phosphorylation pathologique diminue l'affinité de tau pour les microtubules et favorise son agrégation.

25 En traitant ces souris avec des molécules qui augmentent la stabilité des microtubules, on cherche à augmenter la proportion de protéine tau associée aux microtubules et de retarder ainsi l'apparition des symptômes.

Un élevage de ces souris a été entrepris à Bicêtre et un génotypage a permis de sélectionner les souris homozygotes pour le transgène. A l'âge de 21± 3 jours, 3
30 groupes de 10 souris ont été constitués, recevant respectivement en sous-cutané un implant vide, un implant de PREG ou un implant de 3-méthoxy-PREG. Ces implants libèrent 0,38 mg de stéroïde par jour pendant 90 jours. La progression de l'incoordination motrice a été suivie par des tests répétés sur

Rotarod. Seule la 3-méthoxy-PREG a eu un effet bénéfique sur les troubles moteurs (Figure 8).

5 **Exemple 8 : Expériences *in vivo* – Performance mnésique**

Déficit mnésique induit par la colchicine

La colchicine, une substance qui dépolymérise les microtubules sans bloquer la synthèse protéique, est injectée à des doses faibles qui n'induisent pas de mort neuronal dans l'hippocampe de rat. Ces injections entraînent un déficit 10 d'apprentissage résultant d'une dépolymérisation durable des microtubules. L'objectif est de tester l'effet des molécules stabilisatrices des microtubules sur les déficits mnésiques et les lésions histologiques de l'hippocampe induits par la colchicine.

Déficit mnésiques au cours du vieillissement

15 Les études sur le vieillissement sont réalisées sur des rats âgés présentant des déficits mnésiques. L'objectif de cette expérimentation est de pallier ces déficits par un traitement chronique avec nos molécules.

Les expériences de mémoire en deux étapes sont basées sur l'exploration spontanée de la nouveauté et adaptées des expériences décrites par Dellu et al. 20 (1992, Brain Res., 588, 132-9) et Ladurelle et al. (2000, Brain Res., 858, 371-9). Les enseignements techniques de ces deux publications concernant les tests de mémoire spatiale utilisant des labyrinthes sont inclus par référence à la présente demande.

25 **Exemple 9 : Pharmacocinétique**

La pharmacocinétique des molécules testées *in vivo* est réalisée par des dosages effectués par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GCMS)

Une étude a été réalisée avec la PREG et la molécule 43B. Son principal 30 objectif était de démontrer que la molécule 43B passait la barrière hémato-encéphalique.

On a injecté les rats soit avec la PREG, soit avec 43B diluées dans de l'huile de sésame et dosé par GCMS la quantité de PREG ou de 43B dans différents

organes 1h, 4h, 8h et 24h après l'injection (12mg/kg dans 0.5ml d'huile de sésame ; injection en sous-cutanée).

Les résultats présentés figure 9 montrent que la molécule 43B pénètre rapidement dans la moelle épinière et le cerveau des rats injectés, et tend à s'y accumuler.

Ces résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* montrent bien que la molécule 43B (3-méthoxy-PREG) donne des résultats spectaculaires sur la croissance des neurites en culture et sur le modèle de compression médullaire.

10

Exemple 10 : autres molécules selon l'invention

Les indices de liaison et d'activité sont exprimés en % par rapport à la PREG.

La liaison (affinité) est mesurée par déplacement de la PREG-³H.

15 L'activité est mesurée par l'augmentation de densité optique à 345nm d'un mélange de tubuline et de MAP2 purifiées, incubées à 37°C en présence de GTP.

La stimulation de la poussée neuritique est effectuée sur les cellules PC12 différencierées en présence de NGF 10ng/ml et du stéroïde à tester 30 µM pendant 3 jours. Pour chaque condition, la longueur moyenne de 200 neurites, le plus long de 20 chaque cellule, est mesurée sur 3 cultures simultanées.

Les résultats sont représentés par 1, 2 ou 3 + selon que la stimulation est inférieure, égale ou supérieure à celle produite par la PREG.

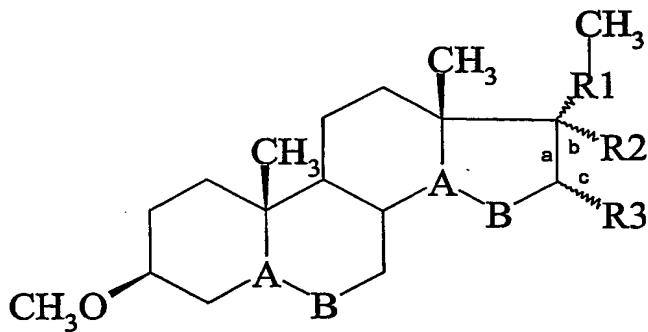
Stéroïde	Affinité	Activité	Pousse neuritique
<i>Prégnénolone (PREG)</i>	100	100	++
<i>3β-méthoxy-prégra-5-ène-20-one</i>	100	100	+++
<i>3β-méthoxy-prégra-5-ène-20-one-17α-dichlorométhyl</i>	53	113	+++
<i>3β-méthoxy-5α-prégnane-20-one</i>	87	10	+++
<i>3β-méthoxy-5α-prégnane-20β-ol</i>	65	65	++
<i>PREG-16α-méthyl</i>	80	70	++
<i>PREG-16β-méthyl</i>	63	67	(++)
<i>3β-hydroxy-prégra-5,14-diène-20-one</i>	102	50	+

<i>PREG-16α,17α-époxy</i>	41	54	+
<i>PREG-16α,17α-méthylène</i>	62	49	+
<i>Prégna-5-ène-3β,20β-diol-20-acétate</i>	60	108	++
<i>3β-hydroxy-5α-prégnane-20-one-16α-méthyl</i>	57	53	(+)

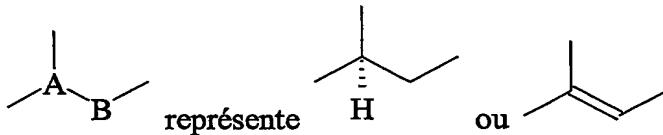
Ces résultats démontrent l'efficacité d'autres molécules dérivées de la prégnénolone pour stimuler la polymérisation des microtubules induite par MAP2, ou la pousse neuritique. Pour celles qui n'ont pas de dérivés 3 β -méthyl, il est
5 prévisible que cette dérivation maintiendra au moins leur activité.

Revendications

1. Utilisation de la 3-méthoxy prégnènolone ou d'une molécule dérivée de la prégnènolone portant une fonction 3-méthoxy et incapable de se convertir en métabolites ou esters sulfate de prégnènolone pour la préparation d'un médicament destiné à stimuler la polymérisation et/ou la stabilisation des microtubules pour traiter une lésion aiguë ou chronique ou une maladie dégénérative du système nerveux, ladite molécule présentant la formule I :
- 5



10 dans laquelle :

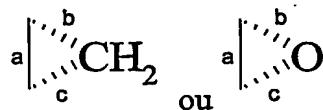


R1 = -CO- ; -CH(OH)- ou -CH(O-COCH₃)-

R2 = H ou CHCl₂,

R3 = H ou CH₃, ou

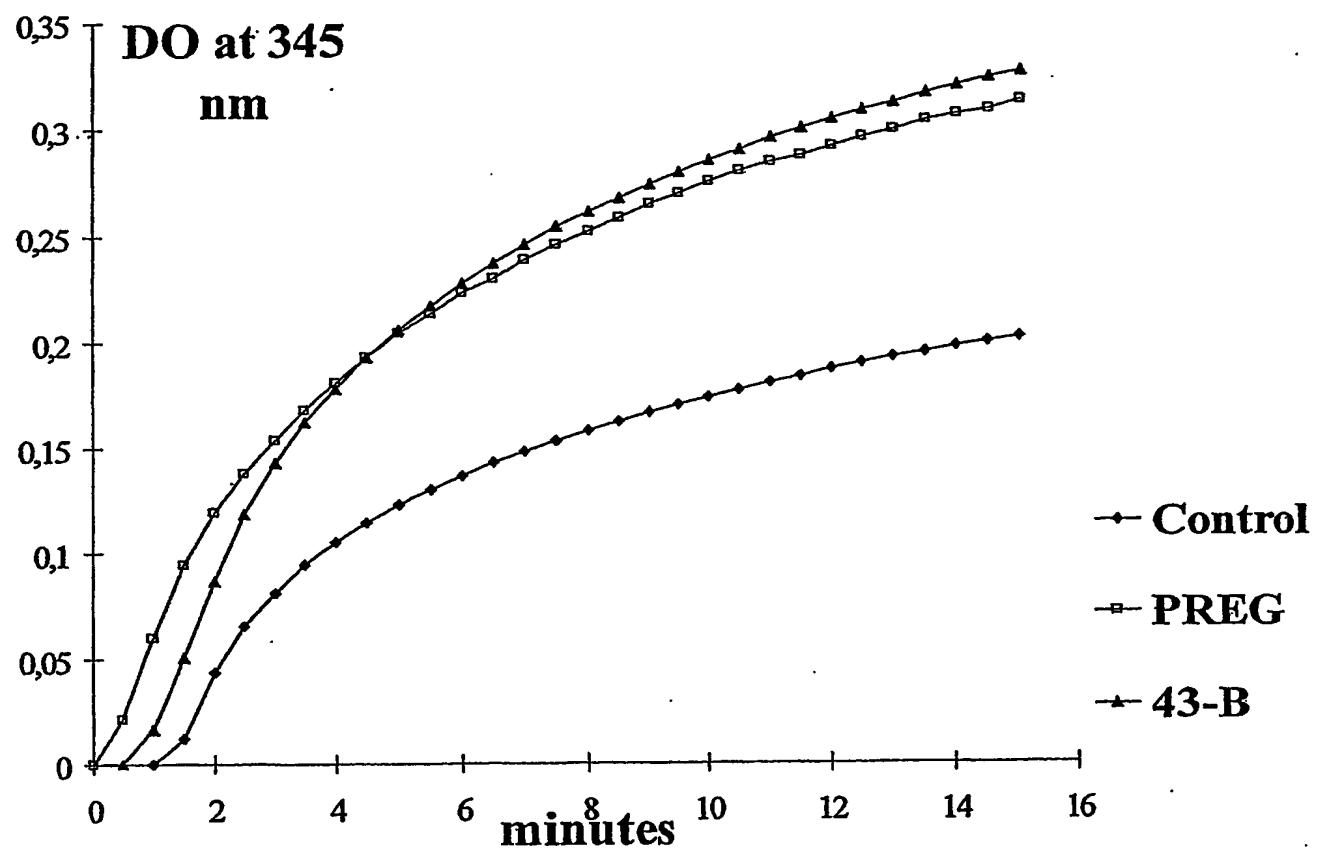
15 R2 et R3 forment ensemble un cycle :



- 20 2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite maladie est choisie dans le groupe constitué de la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la perte de mémoire induite par l'âge, la perte de mémoire induite par la prise de substances, une lésion traumatique, une lésion cérébrale, une lésion de la moelle épinière, en particulier une compression médullaire, l'ischémie, la douleur, notamment la douleur névritique, la dégénérescence nerveuse, et la sclérose en plaques.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit médicament comprend également un excipient permettant de formuler ladite molécule dérivée de prégnènolone pour traverser la barrière hémato-encéphalique.
- 5 4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ledit médicament se présente sous forme injectable.
- 5 5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ledit médicament se présente sous forme permettant une prise orale.
- 10 6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ladite molécule est la 3-méthoxy-PREG.
7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ladite molécule est la 3 β -méthoxy-prégnna-5-ène-20-one- 17 α -dichlorométhyle.
- 15 8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ledit médicament comprend une quantité de 3-méthoxy-prégnènolone ou de molécule dérivée comprise entre 50 et 2500 mg.
9. 3-méthoxy-prégnènolone en tant que médicament.
10. Composition pharmaceutique, comprenant de la 3-méthoxy-prégnènolone ou une molécule dérivée de la prégnènolone portant une fonction 3-méthoxy de formule générale I en tant que principe actif, et un excipient pharmaceutiquement acceptable.
- 20 11. Méthode *in vitro* pour augmenter la stabilisation et/ou induire la polymérisation des microtubules dans une cellule comprenant l'étape d'exposer ladite cellule à la présence de 3-méthoxy-prégnènolone, à une concentration d'environ 0,5 à 50 μ mol.
- 25 12. Méthode *in vitro* pour augmenter la pousse des neurites dans une cellule comprenant l'étape d'exposer ladite cellule à la présence de 3-méthoxy-prégnènolone, à une concentration d'environ 0,5 à 50 μ mol.

1 / 7

**Figure 1**

2 / 7

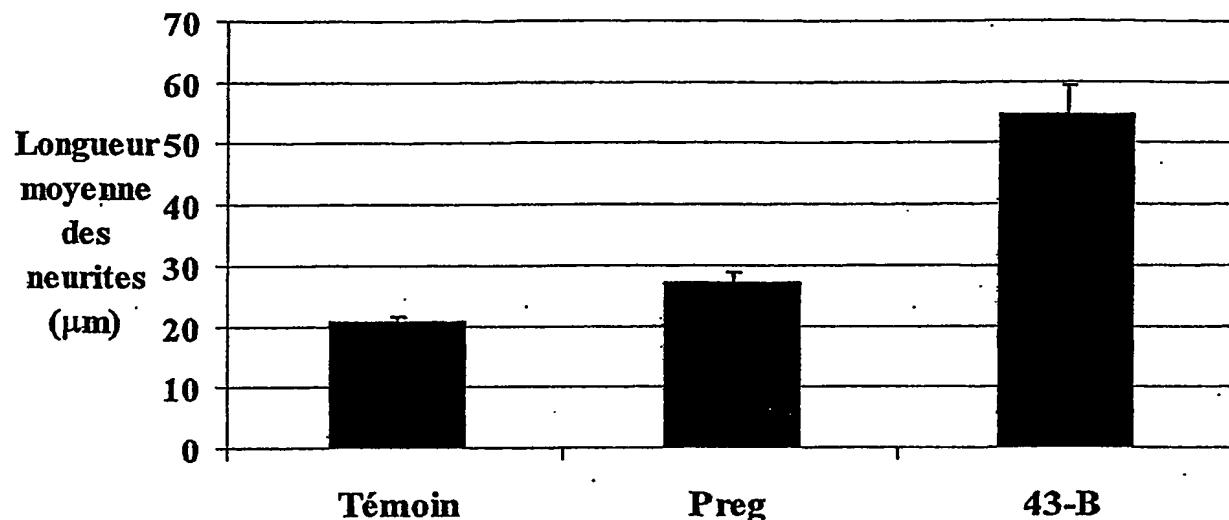
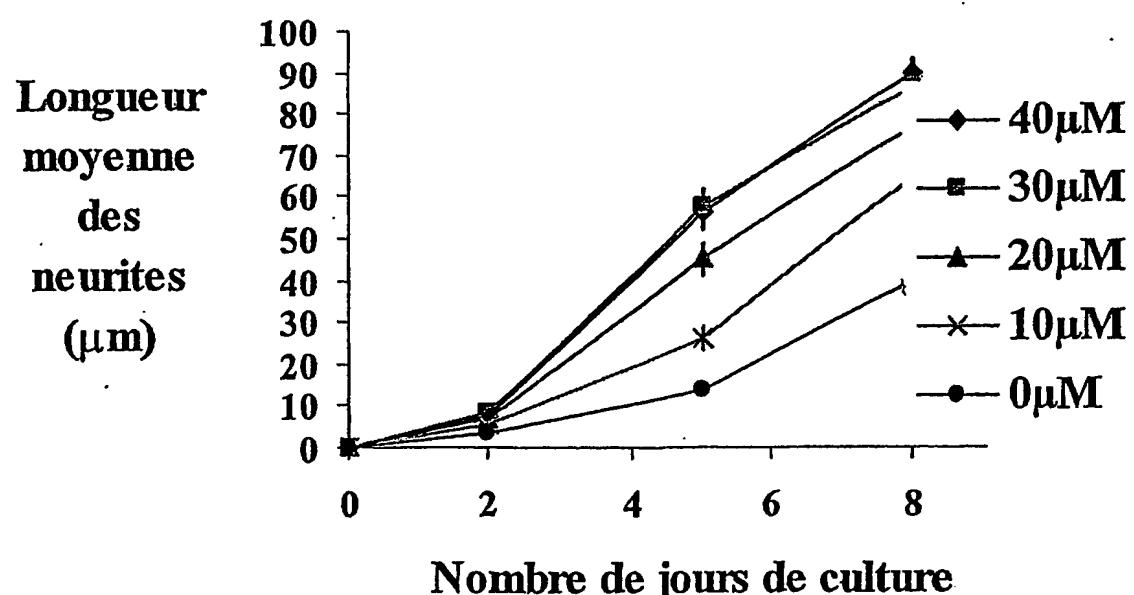
**Figure 2****Figure 3**

Figure n° 4

NGF



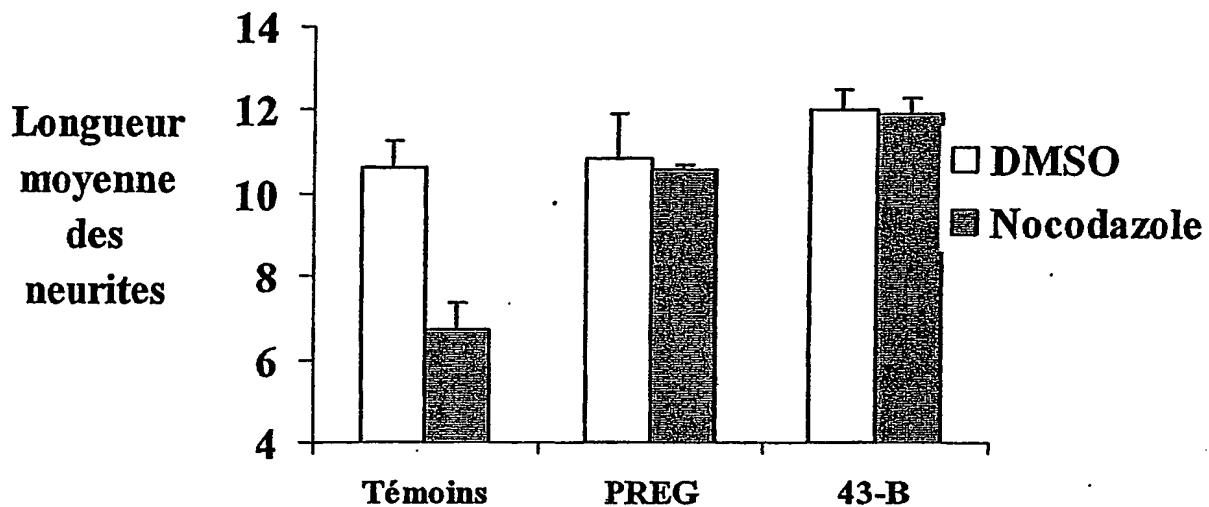
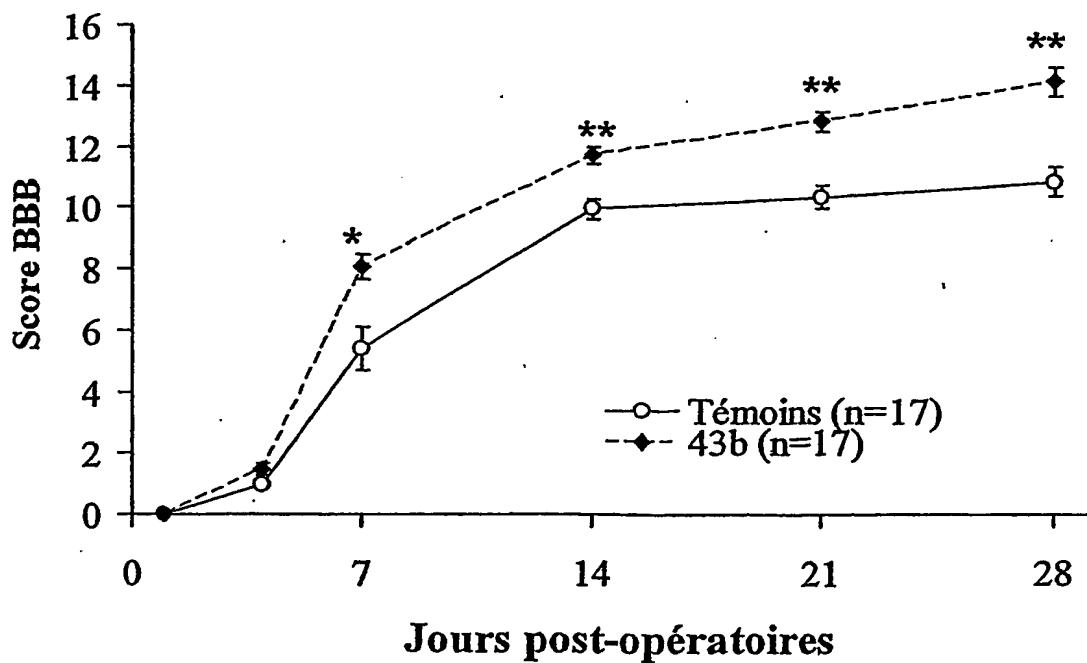
NGF + Preg



NGF + 43B



4 / 7

**Figure 5****Figure 7**

5 / 7

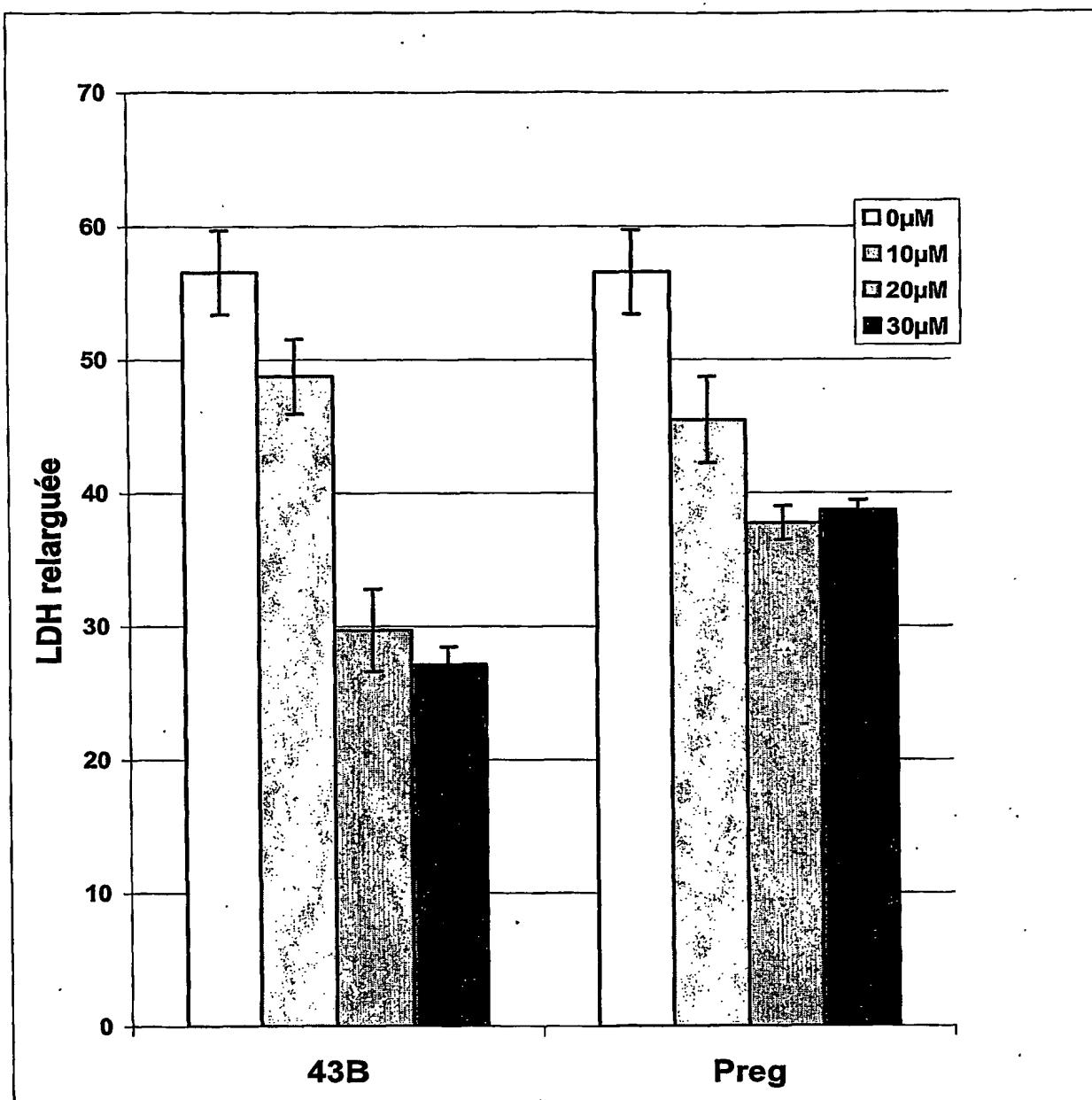


Figure 6

6 / 7

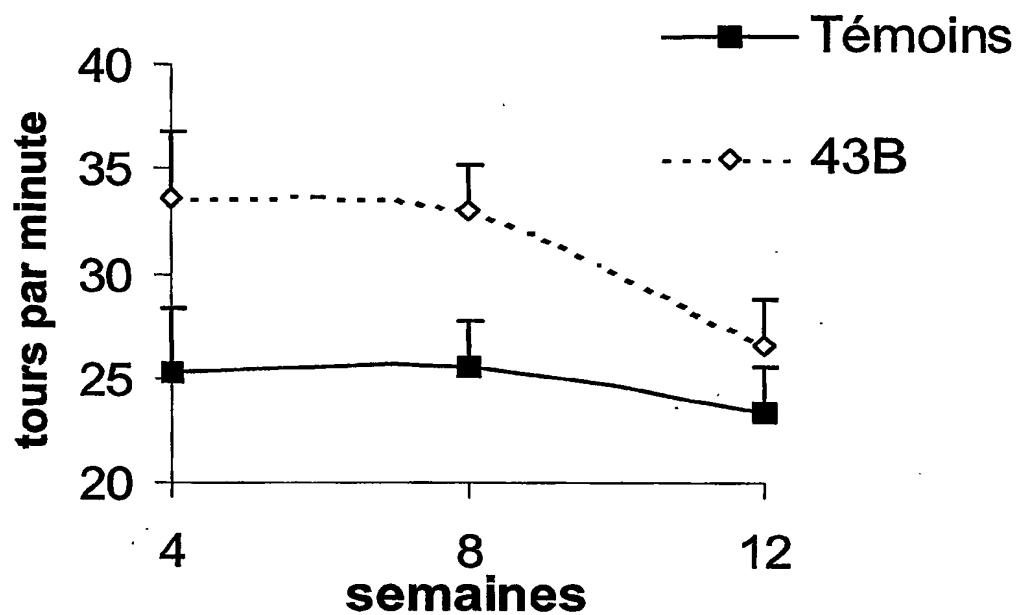
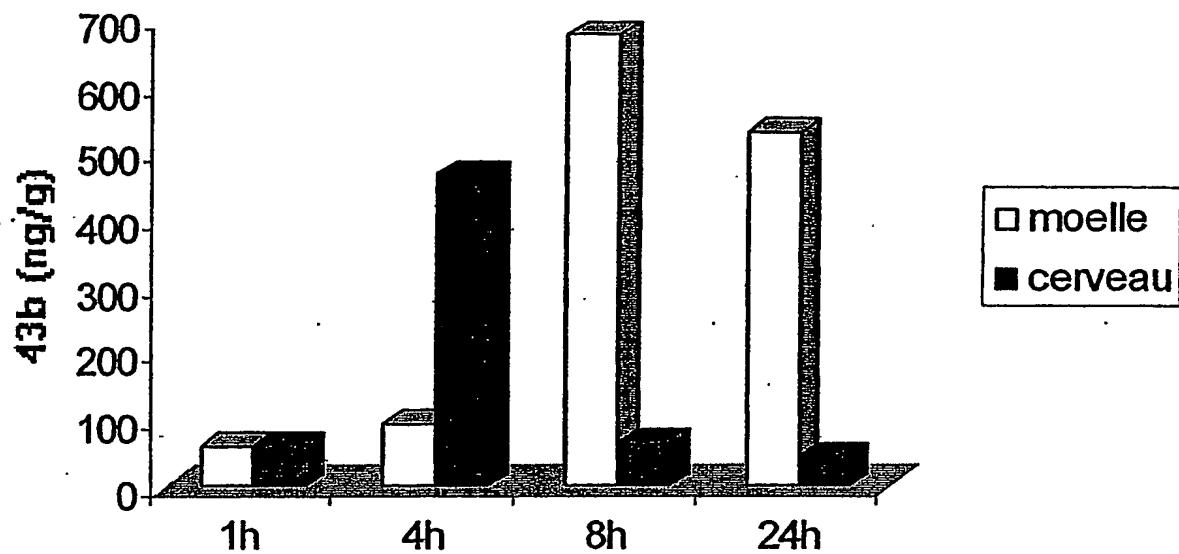


Figure 8

7 / 7

**Figure 9**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR2004/000086

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K31/57 A61P25/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 245 757 B1 (CHOPP MICHAEL ET AL) 12 June 2001 (2001-06-12) column 2, lines 26-45 column 3, line 63 – column 4, line 3 column 4, lines 13-26,50,52,53,58 column 5, lines 4,5,55-66 column 7, lines 10-25 -----	1-6,8-10
Y	WO 01/68068 A (BAULIEU ETIENNE EMILE ;INST NAT SANTE RECH MED (FR); FELLOUS ESTHE) 20 September 2001 (2001-09-20) page 1, lines 1-10; table 2 page 5, lines 13-30 page 7, line 5 – page 8, line 13 page 9, lines 9-15 pages 29-31; table 2 pages 1-6; table 2 pages 29-31 -----	1-12
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 June 2004

Date of mailing of the international search report

06/07/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Houyvet, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/000086

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO 02/36128 A (PIERCE ROBERT CHRISTOPHER ; SADRI VAKILI GHAZALEH (US); SCION PHARM) 10 May 2002 (2002-05-10)</p> <p>page 1, lines 14-25 page 2, line 1 - page 3, line 20; figures 1,11,12 page 8, lines 15-27 page 11, lines 8-18</p> <p>-----</p>	1-12
Y	<p>MURAKAMI K ET AL: "Pregnenolone binds to microtubule-associated protein 2 and stimulates microtubule assembly." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. UNITED STATES 28 MAR 2000, vol. 97, no. 7, 28 March 2000 (2000-03-28), pages 3579-3584, XP000982542 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	11,12
P,X	<p>EP 1 310 258 A (BAULIEU ETIENNE-EMILE ; AKWA YVETTE (FR)) 14 May 2003 (2003-05-14)</p> <p>column 1, paragraph 1 column 3, paragraph 10-15 column 4, paragraph 17 - column 5, paragraph 19 column 7, paragraphs 27,30,32 column 8, paragraph 33</p> <p>-----</p>	1-6,8-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/000086

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 6245757	B1	12-06-2001	NONE -		
WO 0168068	A	20-09-2001	FR	2806303 A1	21-09-2001
			AU	4427101 A	24-09-2001
			CA	2403420 A1	20-09-2001
			EP	1263419 A2	11-12-2002
			WO	0168068 A2	20-09-2001
			US	2003125311 A1	03-07-2003
WO 0236128	A	10-05-2002	AU	1784102 A	15-05-2002
			EP	1347763 A1	01-10-2003
			WO	0236128 A1	10-05-2002
EP 1310258	A	14-05-2003	EP	1310258 A1	14-05-2003
			WO	03039554 A1	15-05-2003

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2004/000086

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K31/57 A61P25/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K A61P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 6 245 757 B1 (CHOPP MICHAEL ET AL) 12 juin 2001 (2001-06-12) colonne 2, ligne 26-45 colonne 3, ligne 63 – colonne 4, ligne 3 colonne 4, ligne 13-26,50,52,53,58 colonne 5, ligne 4,5,55-66 colonne 7, ligne 10-25	1-6,8-10
Y	WO 01/68068 A (BAULIEU ETIENNE EMILE ;INST NAT SANTE RECH MED (FR); FELLOUS ESTHE) 20 septembre 2001 (2001-09-20) page 1, ligne 1-10; tableau 2 page 5, ligne 13-30 page 7, ligne 5 – page 8, ligne 13 page 9, ligne 9-15 pages 29-31; tableau 2 pages 1-6; tableau 2 pages 29-31	1-12
		-/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 juin 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06/07/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Houyvet, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR2004/000086

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>WO 02/36128 A (PIERCE ROBERT CHRISTOPHER ; SADRI VAKILI GHAZALEH (US); SCION PHARM) 10 mai 2002 (2002-05-10) page 1, ligne 14-25 page 2, ligne 1 - page 3, ligne 20; figures 1,11,12 page 8, ligne 15-27 page 11, ligne 8-18</p> <p>-----</p>	1-12
Y	<p>MURAKAMI K ET AL: "Pregnenolone binds to microtubule-associated protein 2 and stimulates microtubule assembly." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. UNITED STATES 28 MAR 2000, vol. 97, no. 7, 28 mars 2000 (2000-03-28), pages 3579-3584, XP000982542 ISSN: 0027-8424 cité dans la demande le document en entier</p> <p>-----</p>	11,12
P,X	<p>EP 1 310 258 A (BAULIEU ETIENNE-EMILE ; AKWA YVETTE (FR)) 14 mai 2003 (2003-05-14) colonne 1, alinéa 1 colonne 3, alinéa 10-15 colonne 4, alinéa 17 - colonne 5, alinéa 19 colonne 7, alinéas 27,30,32 colonne 8, alinéa 33</p> <p>-----</p>	1-6,8-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°
PCT/FR2004/000086

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
US 6245757	B1	12-06-2001	AUCUN		
WO 0168068	A	20-09-2001	FR	2806303 A1	21-09-2001
			AU	4427101 A	24-09-2001
			CA	2403420 A1	20-09-2001
			EP	1263419 A2	11-12-2002
			WO	0168068 A2	20-09-2001
			US	2003125311 A1	03-07-2003
WO 0236128	A	10-05-2002	AU	1784102 A	15-05-2002
			EP	1347763 A1	01-10-2003
			WO	0236128 A1	10-05-2002
EP 1310258	A	14-05-2003	EP	1310258 A1	14-05-2003
			WO	03039554 A1	15-05-2003